



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΡΟΗΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ
LEPUS EUROPAEUS ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ
ΔΕΙΚΤΩΝ ΤΟΥ Υ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ



ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

Μελέτη της γονιδιακής ροής του είδους *Lepus europaeus*
με τη χρήση μοριακών δεικτών του Υ Χρωμοσώματος

Study of the gene flow in the species *Lepus europaeus* by
using molecular markers of Y chromosome

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπον Καθηγητής:

Ζήσης Μαμούρης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μέλη:

Αικατερίνη Μούτου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Σταμάτης

Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον, κ. Κώστα Σταμάτη και την Κα Κατερίνα Μούτου για την συμμετοχή στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Θεμιστοκλή Γιαννούλη για την πολύτιμη βοήθειά του και τις χρήσιμες συμβουλές του, καθώς και τη βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω, επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει στη διάρκεια των μαθητικών και φοιτητικών μου χρόνων και την αμέριστη υποστήριξη τους σε κάθε μου επιλογή.

Περίληψη

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*L. europaeus*) είναι ένα ευρέως διαδεδομένο είδος στην Ευρώπη με μεγάλο οικονομικό και ερευνητικό ενδιαφέρον, διότι αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα θηράματα στην Ευρώπη. Είναι ένα είδος μέσω του οποίου μπορούμε να μελετήσουμε και να εξάγουμε συμπεράσματα για την πληθυσμιακή δομή πολλών θηλαστικών.

Στη μελέτη αυτή, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα υβριδικών πληθυσμών του ευρωπαϊκού λαγού (*L. europaeus*) ώστε να μελετηθούν εξελικτικά γεγονότα, όπως η γονιδιακή ροή και επίδραση που έχει στη διαμόρφωση των φυλογεογραφικών προτύπων του είδους.

Τα δείγματα αναλύθηκαν όσων αφορά στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων του χρωμοσώματος Y, SRY και DBY8. Πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από τα δείγματα και ενισχύθηκαν με PCR. Στη συνέχεια με τεχνική SSCP και τη χρώση τη χρώση πηκτών ακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο, προέκυψε η ομαδοποίηση των δειγμάτων με βάση προηγούμενες μελέτες.

Abstract

The brown hare is a widely known species throughout Europe with great economic and research interest, as it is one of the most important game species in Europe. It is a species which we can study and draw conclusions about the population structure of many mammals.

In this study, samples of hybrid populations of the brown hare (*L. europaeus*) were used to study evolutionary events, such as gene flow and its effect on the formation of phylogenetic patterns of the species.

The samples were analyzed for the nucleotide sequence of the Y chromosome genes, SRY and DBY8. We performed methods such as DNA extraction, PCR, SSCP and the staining of acrylamide gels with silver nitrate, and then the grouping of the samples resulted based on previous studies.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	8
1.1 Φυλογένεση.....	8
1.2 Γονιδιακή Ροή.....	11
1.3 Μοριακοί Δείκτες.....	12
1.4 <i>Lepus europaeus</i>	13
Συστηματική κατάταξη του είδους <i>Lepus europaeus</i>	13
Γενικά Χαρακτηριστικά.....	13
Συμπεριφορά.....	14
Αναπαραγωγή.....	14
Διατροφή.....	14
Γεωγραφικό εύρος.....	15
Επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα.....	15
1.5 Υβριδική Ζώνη.....	16
1.6 Χρωμόσωμα Υ.....	20
1.7 Σκοπός.....	21
2. Υλικά και Μέθοδοι	22
2.1 Υλικά	22
2.2 Μέθοδοι.....	23
2.2.1 Απομόνωση DNA.....	23
2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης	23
2.2.3. PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	24
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης-SSCP.....	25
2.2.4 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO ₃) – Silver staining	26
2.2.5 Αλληλούχιση.....	27
3. Αποτελέσματα	28
3.1 Απομόνωση DNA.....	28
3.2 PCR.....	30
3.3 SSCP.....	31
3.4 Αλληλούχιση	32
4. Συζήτηση.....	36
5. Βιβλιογραφία	39

1. Εισαγωγή

1.1 Φυλογένεση

Μελέτη των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών

Όταν αναφέρεται κανείς στη φυλογένεση, εννοεί τη μελέτη των εξελικτικών σχέσεων των οργανισμών, όπως αυτές διαμορφώνονται με το πέρασμα του χρόνου. Η εξελικτική διαδικασία προχωρά δημιουργώντας διακλαδώσεις, καθώς οι πληθυσμοί μεταβάλλονται στο χρόνο και μπορούν να διαχωρίζονται σε ξεχωριστούς κλάδους (ειδογένεση), να διασταυρώνονται, ή να εξαφανίζονται. Ο προσδιορισμός των φυλογενετικών σχέσεων είναι συνδεδεμένος με την ταξινόμηση των οργανισμών, αφού από την εποχή του Δαρβίνου ακόμη, στόχος των ταξινομητών είναι η ταξινόμηση να αντανakλά όσο πιο πιστά γίνεται τις φυλογενετικές σχέσεις των οργανισμών.

Παλαιότερα η περιγραφή των σχέσεων μεταξύ των οργανισμών γινόταν με τη χρήση μεθόδων, οι οποίες στηρίζονταν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, τη συγκριτική μορφολογία, τη φυσιολογία και άλλα. Οι μέθοδοι ανάλυσης των χαρακτήρων (που ονομάστηκαν κλαδιστικές μέθοδοι) βασίζονται εν γένει στις αρχές που περιγράφηκαν από το Γερμανό εντομολόγο Willi Hennig στο βιβλίο του *Phylogenetic Systematics* (1966). Εφόσον ήταν γνωστό ότι ο γενότυπος ενός ατόμου αντικατοπτρίζεται στο φαινότυπό του, οι μορφολογικοί χαρακτήρες ήταν εκείνοι που χρησιμοποιούνταν κατά κύριο λόγο στις κλαδιστικές μελέτες, γιατί έφεραν πληροφορίες που αντιστοιχούσαν σε μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού. Επιπρόσθετα, ο φαινότυπος είναι εκείνος που υφίσταται τις πιέσεις της φυσικής επιλογής και εξελίσσεται ορατά. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης των μορφολογικών χαρακτήρων, είναι η δυνατότητα χρήσης μεγάλου δείγματος ατόμων στις αναλύσεις, μειώνοντας με τον τρόπο αυτόν την πιθανότητα στατιστικού σφάλματος, καθώς και η δυνατότητα επανάληψης των αναλύσεων με τη χρήση των ίδιων ατόμων, εφόσον είναι δυνατή η διατήρησή τους. Για τους παραπάνω λόγους, η χρήση της μορφολογίας βρισκόταν σε άνθιση μέχρι τη δεκαετία του '80. Οι αναλύσεις που στηρίζονται στη μορφολογία των ατόμων έχουν όμως και μειονεκτήματα, όπως για παράδειγμα το γεγονός ότι οι διαφορετικοί χαρακτήρες είναι, κάποιες φορές, δύσκολο να διακριθούν, συνεπώς πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η υποκειμενικότητα του ερευνητή. Επίσης τα πρότυπα της κληρονομικότητας των μορφολογικών χαρακτήρων δεν είναι πάντα σαφή. Υπάρχουν ακόμη, περιπτώσεις όπου το πλήθος των δεδομένων (διαθέσιμων χαρακτήρων) δεν επαρκεί για την καλή στήριξη των φυλογενετικών υποθέσεων.

Με την ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων, οι οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε όλους τους οργανισμούς και σε κάθε μόριο το οποίο φέρει κάποια πληροφορία για τον οργανισμό, από το DNA μέχρι τις πρωτεΐνες, δόθηκε λύση σε πολλά προβλήματα. Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, όπως η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR), δόθηκε στους ερευνητές η δυνατότητα προσδιορισμού αλληλουχιών

DNA σε μεγάλη κλίμακα, οπότε οι μοριακοί χαρακτήρες έγιναν αναπόσπαστο κομμάτι των φυλογενετικών αναλύσεων. Όταν, λοιπόν, οι επιστήμονες άρχισαν να χρησιμοποιούν τα μοριακά δεδομένα και κυρίως τις αλληλουχίες του DNA, θεωρούσαν πως το DNA παρέχει αποδείξεις οι οποίες επιτρέπουν τον προσδιορισμό της φυλογένεσης όλων των μορφών ζωής. Επιπλέον θεωρείτο ότι τα μοριακά δεδομένα ήταν ανώτερα από τα μορφολογικά, εφόσον χρησιμοποιώντας το DNA ουσιαστικά δουλεύουμε με γονίδια, τα οποία παρέχουν τις απαραίτητες αποδείξεις για τις σχέσεις μεταξύ των ατόμων. Ωστόσο, από την αρχή σχεδόν της χρήσης των μοριακών δεδομένων, ήταν γνωστό ότι οι μέθοδοι αυτές, όπως και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούσαν μορφολογικά δεδομένα, είχαν τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα, τα οποία έχουν ως ακολούθως: ▢ Όταν μελετά κανείς το DNA, κοιτά απευθείας το γενετικό υλικό, το οποίο έχει κληρονομηθεί από τους προγόνους. Το DNA των σύγχρονων οργανισμών προέρχεται από τους προγονικούς οργανισμούς, οπότε το DNA πρέπει να αντανακλά τη γενεαλογία και να είναι αξιόπιστο για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων. Αντιθέτως, όταν κοιτά κανείς μια συγκεκριμένη δομή σε έναν οργανισμό, δεν μπορεί να είναι βέβαιος για τον τρόπο με τον οποίο έχει κληρονομηθεί. Είναι πιθανό η διαμόρφωση της δομής να οφείλεται σε άμεσες περιβαλλοντικές επιρροές και όχι στην κληρονομικότητα. Εφόσον λοιπόν, για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων είναι απαραίτητη η μελέτη των κληρονομούμενων χαρακτηριστικών, η μορφολογία καθίσταται λιγότερο αξιόπιστη για τις φυλογενετικές μελέτες. Ένα από τα προβλήματα των μορφολογικών μελετών είναι το γεγονός ότι οι υπό μελέτη οργανισμοί μπορεί να μοιάζουν εξαιρετικά μεταξύ τους στη μορφολογία, με αποτέλεσμα οι ομοιότητες αυτές να καθιστούν δυσκολότερη την εύρεση ενός αριθμού χαρακτήρων, ικανού για αξιόπιστη συστηματική ανάλυση (Hillis & Wiens 2000). Αντιθέτως, οι αλληλουχίες του DNA αποδείχθηκε ότι είναι ευμετάβλητες ανάμεσα στα είδη και κατά συνέπεια είναι δυνατό να βρεθεί μεγάλος αριθμός χαρακτήρων (θέσεις ζευγών βάσεων) οι οποίοι φέρουν φυλογενετικά πληροφοριακή μεταβλητότητα. Το κόστος βέβαια είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε κάθε μελέτη. Η μελέτη της μορφολογίας είναι πολύ πιο φθηνή από τη μελέτη των αλληλουχιών του DNA. Αυτό σημαίνει ότι με το ίδιο κόστος μπορούμε να μελετήσουμε περισσότερες δομές ενός οργανισμού, απ' ό,τι γονίδια. Στην περίπτωση αυτή η μορφολογία υπερτερεί του DNA. Ωστόσο, η τεχνολογία του DNA γίνεται όλο και πιο φθηνή και γρήγορη με το πέρασμα του χρόνου, οπότε το πλεονέκτημα αυτό της μορφολογίας συνεχώς φθίνει. Όταν μελετά κανείς μορφολογία, μελετά διαφορετικές όψεις του σώματος που πιθανώς κωδικοποιούνται από πολλά διαφορετικά γονίδια. Όταν μελετά το DNA, συνήθως η τεχνολογία και τα χρήματα επαρκούν για τη μελέτη ενός γονιδίου, ή έστω ενός μικρού αριθμού γονιδίων. Ένα πιθανό πρόβλημα που μπορεί να προκύψει από τη μελέτη ενός μόνο γονιδίου είναι πως δε μπορούμε να γνωρίζουμε αν αλληλεπιδρά με άλλα γονίδια και ποια είναι αυτά, οπότε όποιους χαρακτήρες αναφέρουμε ως ξεχωριστούς, μπορεί να εξελίσσονται κατά συσχετιζόμενο τρόπο, πράγμα που καθιστά τη φυλογένεση λιγότερο αξιόπιστη. Εάν η μελέτη αφορά χαρακτηριστικά που κωδικοποιούνται από πολλά γονίδια, είναι λιγότερο πιθανό η εξέλιξή τους να συσχετίζεται.

Ο προσδιορισμός των χαρακτηριστικών που μοιάζουν μεταξύ τους και ίσως να είναι ομόλογα, μπορεί να είναι πρόβλημα τόσο για τα μορφολογικά όσο και για τα μοριακά δεδομένα. Για τα μορφολογικά δεδομένα, συνήθως δε γνωρίζουμε ποια γονίδια κωδικοποιούν συγκεκριμένες δομές, συνεπώς από την ομοιότητα και μόνο μπορεί να συμπεράνει κανείς ότι οι χαρακτήρες είναι ομόλογοι, ενώ στην πραγματικότητα κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και θα έπρεπε να θεωρούνται διαφορετικοί. Αυτό μπορεί να κάνει τη φυλογένεση αναξιόπιστη. Στην εξέλιξη του DNA, ένα αρκετά σύνηθες συμβάν είναι ο διπλασιασμός των γονιδίων, οπότε αντί για ένα αντίγραφο του γονιδίου σε μια θέση στα χρωμοσώματα, υπάρχουν δύο αντίγραφα σε διαφορετικές θέσεις που εξελίσσονται παράλληλα. Εφόσον λοιπόν η μελέτη αφορά γονίδια, υπάρχει η πιθανότητα της τυχαίας σύγκρισης του αρχικού γονιδίου ενός είδους με τη διπλασιασμένη μορφή του, σε κάποιο άλλο είδος. Αυτά τα δύο γονίδια δεν είναι πραγματικά ομόλογα. Ένα ακόμη πρόβλημα που παρουσιάζεται στον καθορισμό της ομολογίας του DNA είναι η συχνή εμφάνιση μεταλλάξεων που προσθέτουν ή αφαιρούν ζεύγη βάσεων σε ένα γονίδιο. Το αποτέλεσμα είναι το διαφορετικό μήκος του ίδιου γονιδίου σε διαφορετικά είδη. Όταν συμβαίνει αυτό, είναι δύσκολη η σωστή στοίχιση των γονιδίων, ώστε να είναι βέβαιο ότι συγκρίνονται οι σωστές βάσεις μεταξύ των γονιδίων δύο ή περισσότερων ειδών. Συνεπώς, τόσο η μορφολογία όσο και το DNA, εμφανίζουν μειονεκτήματα στην εύρεση των κατάλληλων χαρακτήρων για τον προσδιορισμό της ομολογίας. Από την άλλη, μεγάλο μέρος του γενετικού υλικού μπορεί να είναι ουδέτερο στη δράση της φυσικής επιλογής, που σημαίνει ότι όλες οι διαφορετικές μορφές DNA σε έναν πληθυσμό έχουν την ίδια αρμοστικότητα και δεν εξελίσσονται μέσω της φυσικής επιλογής. Συνεπώς, για την περίπτωση αυτή, η φυσική επιλογή δεν μπορεί να προκαλέσει συγκλίνουσα εξέλιξη εφόσον δεν επηρεάζει το κομμάτι αυτό του DNA. Αυτό μπορεί να είναι ένα προνόμιο για τη μελέτη της φυλογένεσης βάσει του DNA. Δυστυχώς, όμως, τα μοριακά δεδομένα μπορεί να εμφανίσουν τυχαία συγκλίνουσα εξέλιξη, λόγω μεταλλάξεων υποκατάστασης ζευγών βάσεων, που είναι και τα σημεία τα οποία μελετώνται στις φυλογενετικές αναλύσεις βάσει μοριακών δεδομένων. Επειδή υπάρχουν μόνο τέσσερις διαφορετικές βάσεις, δεν αποκλείεται δύο διαφορετικά είδη να έχουν τυχαία την ίδια μετάλλαξη στο ίδιο σημείο, ενώ εξελίσσονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Το πρόβλημα, λοιπόν, της τυχαίας σύγκλισης παρατηρείται συχνά στις φυλογενετικές αναλύσεις βάσει του DNA. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης του DNA μπορεί να είναι ο ρυθμός εξέλιξης των γονιδίων. Είναι πιθανό το ίδιο γονίδιο σε διαφορετικά είδη να εξελίσσεται με τον ίδιο ρυθμό. Αυτό όμως δεν έχει τεκμηριωθεί απόλυτα.

Οι καταλληλότερες λοιπόν, μελέτες όσον αφορά τη φυλογένεση βασίζονται σε συνδυασμό διαφορετικών ειδών δεδομένων. Είναι σαφές ότι οι μελέτες αυτές είναι πιο ολοκληρωμένες και είναι λιγότερο πιθανό να - περιέχουν σφάλματα όσον αφορά τα συμπεράσματα που εξαγονται, ιδιαίτερα δε εάν αυτά συμφωνούν ανάμεσα σε διαφορετικά είδη αναλύσεων (Bininda— Emonds 2000).

1.2 Γονιδιακή ροή

Η γονιδιακή ροή περιγράφει την είσοδο στη γενετική δεξαμενή ενός πληθυσμού, γονιδίων από έναν ή περισσότερους άλλους πληθυσμούς. Συνήθως οι πληθυσμοί αυτοί ανήκουν στο ίδιο είδος, σε μερικές περιπτώσεις, όμως, γίνεται υβριδισμός ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, τα οποία δεν είναι πλήρως αναπαραγωγικά απομονωμένα. Η ποικιλότητα που προέρχεται από υβριδισμό συχνά υπερβαίνει την εσωτερική ποικιλότητα καθενός από τα γονικά είδη. Κάποιες φορές ο υβριδισμός είναι δυνατόν να δώσει γενετική ποικιλότητα επαρκή για προσαρμογή σε περιβάλλοντα που φυσιολογικά θα ήταν απρόσιτα για ένα είδος .

Η γονιδιακή ροή λαμβάνει χώρα είτε με μετακίνηση ατόμων μεταξύ δύο πληθυσμών, όπως μέσω της μετανάστευσης, είτε με μεταφορά γαμετών. Αποτελεί συντηρητικό παράγοντα που αποτρέπει την απόκλιση μερικώς απομονωμένων πληθυσμών και συμβάλλει σημαντικά στη σταθερότητα των διαδεδομένων ειδών και τη στάση των πολυπληθών ειδών. Διαφέρει ανάλογα με τον πληθυσμό και το είδος και μειώνει τις διαφορές των γενετικών δεξαμενών. Ανάλογα, λοιπόν, με τη δομή των πληθυσμών στους οποίους αναφερόμαστε, διακρίνονται διάφορα μοντέλα γονιδιακής ροής όπως τα εξής:

- Μοντέλο «ήπειρος – νησί», στο οποίο το ενδιαφέρον έγκειται στη ροή από ένα μεγάλο πληθυσμό (ήπειρο) σε έναν άλλο πολύ μικρότερο (νησί). [2]
- Μοντέλο «νησιών», στο οποίο η ροή γίνεται μεταξύ μικρών πληθυσμών κατά τυχαίο τρόπο. [2]
- Μοντέλο «βηματισμού», στο οποίο οι πληθυσμοί είναι πολυάριθμοι, η γονιδιακή ροή όμως γίνεται μόνο μεταξύ γειτονικών πληθυσμών, μέσα στο χρονικό διάστημα μιας γενιάς. [2]
- Μοντέλο «απομόνωσης λόγω απόστασης», στο οποίο η γονιδιακή ροή είναι συνάρτηση της απόστασης μεταξύ τοπικών πληθυσμών που συναποτελούν μια συνέχεια.

1.3 Μοριακοί Δείκτες

Ως μοριακός δείκτης μπορεί να χαρακτηριστεί ένα γονίδιο ή DNA αλληλουχία με μια γνωστή θέση σε ένα χρωμόσωμα και που σχετίζονται με ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή χαρακτηριστικό. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον για τους μοριακούς δείκτες, αποκαλύπτοντας πολυμορφισμούς σε επίπεδο DNA, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξελικτική βιολογία και σε φυλογενετικές μελέτες.

Η χρήση των μοριακών δεικτών είναι ευρέως διαδεδομένη στη διάκριση των πληθυσμών, καθώς:

- (α) ενυπάρχουν στα άτομα (δηλαδή, δεν μπορούν να χαθούν)
- (β) είναι κληρονομήσιμοι
- (γ) δεν απαιτείται θανάτωση του ζώου για τη μελέτη τους.

Οι γενετικοί δείκτες μπορεί να προέρχονται από:

1. Αλληλουχίες μιτοχονδριακού (mt) DNA
2. Αλληλουχίες χλωροπλαστικού (cp) DNA
3. Αλληλουχίες πυρηνικού DNA

Γενικότερα, υπάρχει ποικιλία μοριακών δεικτών καθώς υπάρχουν πολλά διαφορετικά γονιδιώματα με διαφορετικούς τύπους γενετικών δεικτών.

Παρόλα αυτά, δεν μπορεί να πει κανείς με βεβαιότητα ότι υπάρχουν συγκεκριμένοι μοριακοί δείκτες οι οποίοι είναι κατάλληλοι για κάθε είδους φυλογενετική ανάλυση. Για να επιλεγεί ο πιο κατάλληλος μοριακός δείκτης πρέπει να έχει κάποιες ιδιότητες, όπως για παράδειγμα να: ☐ είναι διακριτός και ευρέως εξαπλωμένος, ☐ είναι εύκολος στην απομόνωση και την ανάλυση, ☐ έχει απλή γενετική δομή, ☐ έχει ξεκάθαρο τρόπο κληρονόμησης, ☐ έχει γρήγορο ή αργό ρυθμό εξέλιξης, ανάλογα με τα είδη που μελετώνται, ☐ έχει ποιοτικούς χαρακτήρες από τους οποίους να μπορούν να εξαχθούν φυλογενετικά συμπεράσματα.

1.4 *Lepus europaeus*

Συστηματική κατάταξη του είδους *Lepus europaeus*

Πίνακας 1: Επιστημονική ταξινόμηση *L. europaeus*

Βασίλειο	Ζώα
Φύλο	Χορδωτά
Υπό-φυλο	Σπονδυλωτά
Κλάση	Θηλαστικά
Τάξη	Λαγόμορφα
Οικογένεια	Leporidae
Γένος	<i>Lepus</i>
Είδος	<i>europaeus</i>



Εικόνα 1: *L. europaeus*

Γενικά Χαρακτηριστικά

Ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*) είναι είδος ευρέως διαδεδομένο στην Ευρώπη και τη δυτική Ασία. Είναι ένα θηλαστικό προσαρμοσμένο σε περιοχές με εύκρατο κλίμα. Σχετίζεται και είναι παρόμοιος μορφολογικά με το ευρωπαϊκό κουνέλι, το οποίο ανήκει στην ίδια οικογένεια με το λαγό, αλλά σε διαφορετικό γένος. Ο ευρωπαϊκός λαγός έχει συνολικό μήκος που κυμαίνεται από 60 έως 75cm και ζυγίζει από 3 έως 5 κιλά (Hall and Kelson, 1959, Peterson 1966). Το χρώμα του είναι καστανόγκριζο έως γκριζο καφέ, εκτός από την περιοχή της κοιλιάς που είναι γκρι- άσπρη. Το κεφάλι έχει καφέ αποχρώσεις με πιο ανοιχτόχρωμους κύκλους γύρω από τα μάτια. Έχει μακριά αυτιά, τα πίσω πόδια του είναι πιο μακριά από τα μπροστινά, ενώ τα πέλματά του καλύπτονται από παχύ τρίχωμα για να εμποδίζουν την ολίσθηση. Η ουρά, με μήκος συνήθως 7-11cm, είναι μαύρη στο επάνω μέρος της και άσπρη στο κάτω. Η διάρκεια ζωής του φτάνει τα 7-8 χρόνια (Peterson, 1966, Bansfield, 1974). Το χειμώνα το τρίχωμα του ευρωπαϊκού λαγού γίνεται ελαφρώς πιο γκριζο. Επίσης, δεν έχει παρατηρηθεί αξιοσημείωτος διμορφισμός ανάμεσα στα δύο φύλα. Η μοναδική διαφορά που έχει παρατηρηθεί είναι ότι τα αρσενικά έχουν συνήθως πιο παχύ και κοντό λαιμό σε σχέση με τα θηλυκά άτομα (Bansfield, 1974, Dragg, 1974).

Συμπεριφορά

Ο ευρωπαϊκός λαγός είναι μοναχικό ζώο, εκτός από την εποχή ζευγαρώματος. Παρουσιάζουν εξαιρετική αίσθηση όρασης, οσμής και ακοής. Κατά την ανίχνευση ενός αρπακτικού, οι ευρωπαϊκοί λαγοί τρέξουν για να διαφύγουν και μπορούν να αποφύγουν και να αλλάξουν κατεύθυνση γρήγορα εάν χρειαστεί. Είναι πολύ γρήγοροι και έχουν προγραμματιστεί με ταχύτητα έως και 35 mph (περίπου 60 km / h) σε ευθεία γραμμή. Επίσης, θα βουτήξουν σε ρέματα εάν χρειαστούν, καθώς είναι αξιοπρεπείς κολυμβητές (William and Whitaker, Bansfield, 1974).

Αναπαραγωγή

Ο ευρωπαϊκός λαγός είναι ένα είδος που μπορεί να αναπαραχθεί όλο το χρόνο. Ωστόσο, η κύρια περίοδος αναπαραγωγής είναι από το τέλος του χειμώνα έως τις αρχές του φθινοπώρου ενώ στο βόρειο ημισφαίριο αυτό συμβαίνει από τα τέλη Φεβρουαρίου έως τον Αύγουστο (Broekhuizen και Maaskamp, 1981). Μπορούν να φτάσουν στην εφηβεία μόλις 4-6 μήνες και μπορούν να γεννήσουν καλά αναπτυγμένα νεογνά περίπου 100 γραμμάρια, καλυμμένα με γούνα και με τα μάτια και τα αυτιά ήδη ανοιχτά. Οι λαγοί σχηματίζουν ρηχικές κοιλότητες στο έδαφος - μορφές - στις οποίες στηρίζονται και στις οποίες γεννιούνται οι νέοι. Οι νέοι, επίσης γνωστοί ως leverets, στη συνέχεια διασκορπίζονται γρήγορα στη γύρω περιοχή για να αποφύγουν την προσέλευση αρπακτικών. Η ετήσια παραγωγικότητα των θηλυκών ποικίλλει ευρέως, με μέγιστη παραγωγικότητα στη μέση της σεζόν. Ο μέσος συνολικός αριθμός των νεαρών που παράγονται ανά θηλυκό ανά έτος κυμαίνεται από 5-13 ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, με περίοδο κυήσεως 41-42 ημερών.

Διατροφή

Ο *L. europaeus* έχει μια σχετικά γενικευμένη φυτοφαγική διατροφή, η οποία περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία αγρωστωδών, ζιζανίων και αγροτικών καλλιεργειών (δημητριακά, παντζάρια κ.λπ.) κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, με κάποια προφανή προτίμηση για βότανα πλούσια σε λιπαρά. Έχουν τη δυνατότητα διαστολής διατροφής κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ιδιαίτερα σε συνδυασμό με υψηλή χιονοστιβάδα, για να συμπεριλάβουν φλοιούς δέντρων και τερματικούς βλαστούς από διάφορα είδη, ιδιαίτερα *Prunus spinosa* και *Crataegus monogyna* (Rodel et al., 2004, Reichlin et al.).

Γεωγραφικό εύρος

Η φυσική κατανομή των ευρωπαϊκών λαγών περιλαμβάνει τη Μεγάλη Βρετανία και τη Δυτική Ευρώπη, ανατολικά μέσω της Μέσης Ανατολής προς την Κεντρική Ασία (Lincoln, 1974, Broekhuizen and Maaskamp, 1980, Caillol and Meunier, 1989, Poli et al., 1991). Έχουν εισαχθεί από ανθρώπους σε πολλές άλλες ηπείρους. Στον Καναδά, ο ευρωπαϊκός λαγός βρίσκεται στο νότιο Οντάριο, γύρω από τις Μεγάλες Λίμνες και νότια της Καναδικής Ασπίδας, ενώ έχει αποτύχει να εξαπλωθεί περαιτέρω βόρεια. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι ευρωπαϊκοί λαγοί βρίσκονται τώρα στα βορειοανατολικά κράτη και στις Μεγάλες Λίμνες (Hall and Kelson, 1959). Έχουν επίσης εισαχθεί σε περιοχές της Νότιας και Κεντρικής Αμερικής (Bonino and Montenegro, 1997) και στην Αυστραλία.



Εικόνα 2: Γεωγραφική κατανομή του *Lepus europaeus* (<https://www.cabi.org>)

Επιπτώσεις στη βιοποικιλότητα

Ο ευρωπαϊκός λαγός αναγνωρίζεται ως σημαντικό γεωργικό και δασικό παράσιτο σε ορισμένες περιοχές όπου έχουν εισαχθεί και επίσης ως οικολογικά επιβλαβή είδη μέσω του ανταγωνισμού και του υβριδισμού με αυτόχθονα είδη και της ενδεχόμενης υπερβόσκησης των σπάνιων φυτικών κοινοτήτων. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε τμήματα της Νότιας Αμερικής, της Αυστραλίας και της Νέας Ζηλανδίας (Flux, 1990 · Bonino et al., 2010).

1.5 Υβριδική Ζώνη

Οι υβριδικές ζώνες θεωρούνται ως "φυσικά εργαστήρια" για τη μελέτη ενεργών εξελικτικών δυνάμεων σε πληθυσμούς που κατοικούν σε αυτές τις περιοχές (Emerson, 2002, Hewitt, 1988). Οι υβριδικοί πληθυσμοί σχηματίζονται σε περιοχές όπου δύο διαφορετικά γονιδιώματα συναντώνται και υβριδοποιούνται (Barton, 1989). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων παγετώνων που έλαβαν χώρα στο τεταρτημόριο, οι πληθυσμοί του Βορρά μειώθηκαν δραματικά με εξαφάνιση ή με μετανάστευση προς νότια και θερμότερα εδάφη (Hewitt, 2000, Hewitt, 2004). Στο παράδειγμα της Ευρώπης, ο βόρειος πληθυσμός έχει μεταναστεύσει στον Νότο, όπου μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί ορισμένες και ξεχωριστές φυλές για το είδος στην Ιταλία, την Ιβηρική Χερσόνησο, τα Βαλκάνια και την Ανατολία (Hewitt, 2000, Taberlet et al. 1998). Η απομόνωση αυτών των πληθυσμών για μεγάλο χρονικό διάστημα είχε σαν αποτέλεσμα τη γενετική διαφοροποίησή τους. Η επακόλουθη μετά-παγετώδης επέκταση των πληθυσμών οδήγησε στο σχηματισμό των υβριδικών ζωνών, όπου συναντήθηκαν διαφορετικά γονιδιώματα, αλλά οι διαφορές τους ήταν υπεύθυνες για την υβριδική ανικανότητα (Hewitt, 2004). Η γενετική διαφοροποίηση των γονιδιωμάτων μπορεί να είναι αποτέλεσμα επιλογής ή μετατόπισης.

Παρά την υβριδοποίηση, οι ενδοειδικές σειρές δεν αναμιγνύονται γεωγραφικά, πράγμα που θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της κλασικής υβριδικής ανικανότητας: Τα υβρίδια F1 είναι συνήθως εύφορα και καλά προσαρμοσμένα, αλλά τα υβρίδια F2 τείνουν να παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα ικανότητας και προσαρμογής (Hewitt, 1988, Burton RS et al., 2006, Smith S et al., 2010). Πιστεύεται ότι οι υβριδικές ζώνες διατηρούνται με τη δράση δύο διαφορετικών διεργασιών: τυχαία διασπορά και επιλογή έναντι υβριδίων (Barton, 1989). Η μειωμένη καταλληλότητα των υβριδίων προκαλείται συνήθως από πολλά γονίδια με μικρή επίδραση, τα οποία διαδίδονται σε όλα τα γονιδιώματα, αλλά μάλλον από τη μεγάλη συμβολή μερικών γονιδίων (Hewitt, 1988). Έτσι, τα αλληλόμορφα που διασχίζουν τη ζώνη επιλέγονται αρνητικά: βρίσκονται σε λανθασμένο περιβάλλον ή συνδυάζονται με λανθασμένα αλληλόμορφα (Barton, 1989). Αυτοί οι παράπλευροι πληθυσμοί και οι υβριδικές ζώνες μπορεί να αντικατοπτρίζουν τα διαφορετικά στάδια που αντιστοιχούν στα επίπεδα κλιμάκωσης της διαφοροποίησης: από διαφορετικούς πληθυσμούς, μέχρι διαφορετικά είδη (Hewitt, 1988). Η ύπαρξη υβριδικών ζωνών έχει χαρακτηριστεί καλά για μια ποικιλία ειδών, όπως η ακρίδα, η σκαντζόχοιρος, ο ποντικός και ο ευρωπαϊκός λαγός (Bilgin R., 2011)

Ένα πρότυπο ενός είδους για τη μελέτη των παραπάνω εξελικτικών δυνάμεων που δρουν σε πολλαπλά επίπεδα δυναμικής του πληθυσμού είναι ο ευρωπαϊκός λαγός (*Lepus europaeus*). Η κατανομή του καφέ λαγού καλύπτει την Ευρώπη και την Ανατολία και έχει εισαχθεί στο παρελθόν στη Νότια Αμερική, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία (Flux, 1983). Είναι επίσης παρούσα στα ευρωπαϊκά νησιά, όπως το Ηνωμένο Βασίλειο και τα νησιά της Μεσογείου. Οι εισαγωγές των ειδών σε αυτά τα νησιά ακολούθησαν δύο κύριες διαδρομές: α) μετεγγραφές με ανθρώπινη μεσολάβηση, για σκοπούς ανανέωσης για κυνήγι ή ως σύμβολο γονιμότητας κατά τη διάρκεια μεταναστεύσεων ή / και β) με μετακίνηση μέσω προσωρινών γεφυρών που συνέδεαν την ηπειρωτική χώρα με τα νησιά και έδωσε τους τη δυνατότητα να μεταναστεύσουν . Έτσι, οι λαγοί από νησιά με εγγύτητα προς την Ανατολή, όπως η Χίος ή η Λέσβος, προέρχονταν από την Ανατολία και μετανάστευσαν όταν η στάθμη της θάλασσας ήταν αρκετά χαμηλή κατά την τελευταία Παγετονική περίοδο (Suchentrunk F. et al., 2006, Kasapidis P et al., 2005).

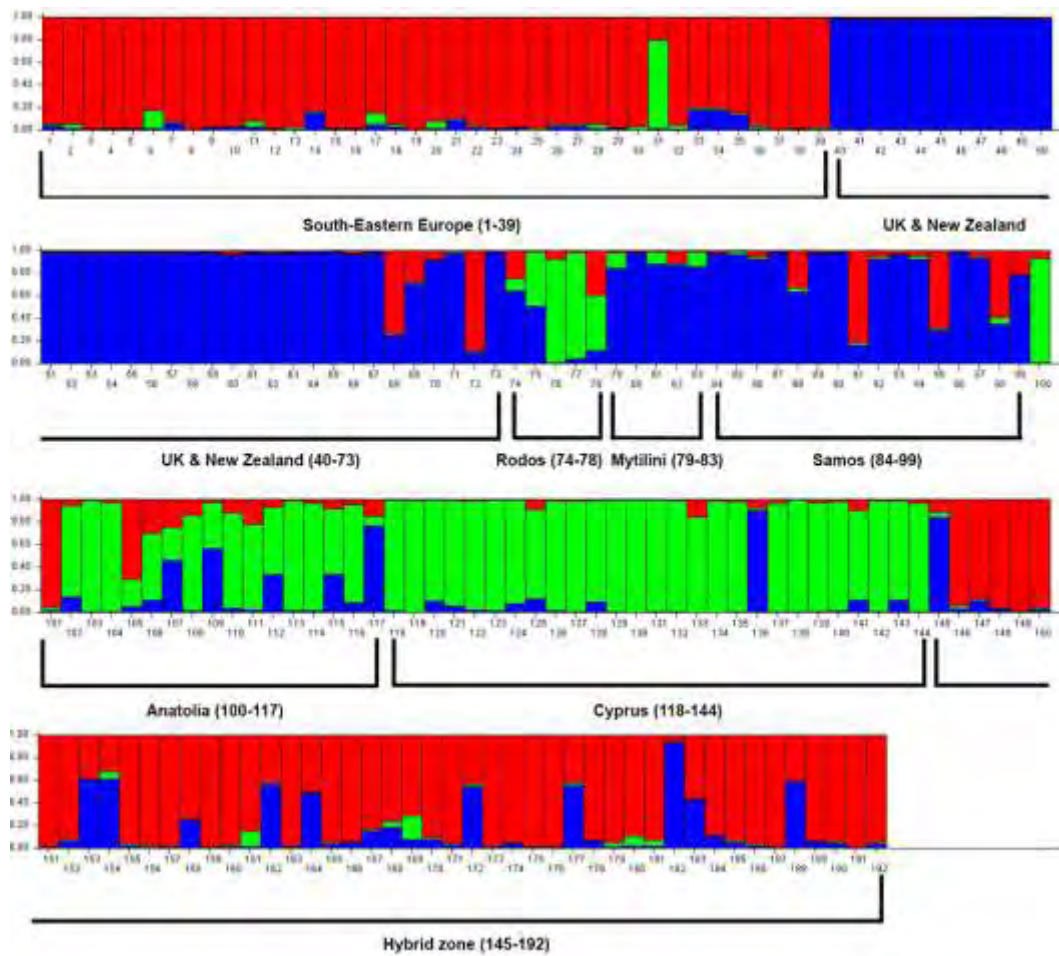
Δύο σημαντικές μελέτες για τη φυλογεωγραφία του είδους αποκάλυψαν την ύπαρξη δύο καλά διαχωρισμένων, χωρικά και γενετικά, κλαδιών: Ο ευρωπαϊκός κλάδος, που μπορεί να υποδιαιρεθεί σε υποκεφάλαιο της Κεντρικής Ευρώπης και της Νοτιοανατολικής Ευρώπης και ο Ανατολικός κλάδος (Kasapidis P et al., 2005, Stamatis C et al., 2009). Η ευρωπαϊκή ομάδα είναι παρούσα σε ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Γερμανία, η Γαλλία, η Ιταλία, η Ελλάδα, κλπ., Ενώ το ανατολικό κράτος περιλαμβάνει την Ανατολία, την Κύπρο, το Ισραήλ και τα νησιά της Μεσογείου που βρίσκονται κοντά στις ακτές της Ανατολίας. Παρά τη διακριτή γεωγραφική κατανομή της κάθε κατηγορίας, υπάρχει μια ζώνη επαφής στη Βόρεια Ελλάδα και τη Βουλγαρία, όπου συναντώνται οι δύο κλάδοι και αποτελούν μια υβριδική ζώνη. Η κατανομή των κλάδων φαίνεται στην εικόνα3. Μια πρόσφατη μελέτη του πληθυσμού της υβριδικής ζώνης έχει αποκαλύψει ότι η παρεμβατική ομάδα είναι η Ανατολή και βρέθηκαν επίσης περιοχές γενετικής ασυνέχειας, γεγονός που δείχνει την μειωμένη ροή των γονιδίων μεταξύ των ομάδων. Η μειωμένη ροή του γονιδίου μεταξύ των κλάδων στη ζώνη επαφής μπορεί να έχει οδηγήσει σε ένα ενδιαφέρον γεγονός, που είναι η απουσία γεωγραφικού μίγματος των κλαδιών οπουδήποτε αλλού εκτός της υβριδικής ζώνης. Δεν έχει βρεθεί κανένα άτομο που να φέρει τον ευρωπαϊκό απλότυπο στην Ανατολία και αντίστροφα (Stamatis C et al., 2009, Antonίου A et al., 2013). Ο Djan και οι συνεργάτες του (Djan M et al., 2017), χρησιμοποιώντας μια εκτεταμένη δειγματοληψία στα Βαλκάνια (Σερβία, Κοσσόβου, Βουλγαρία, ΠΓΔΜ) και μια μερική περιοχή ελέγχου του μιτοχονδριακού DNA, πρότειναν ένα εκλεπτυσμένο φυλογενετικό μοντέλο για το είδος, το οποίο είναι σύμφωνο με τα προηγούμενα , ενώ παρατήρησαν επίσης την έλλειψη μετακίνησης του Ανατολικού προτύπου περαιτέρω από τη ζώνη επαφής στη Βουλγαρία και τη Βόρεια Ελλάδα.



Εικόνα 3: Γεωγραφική κατανομή ομάδων Ευρώπης, Ανατολής και η υβριδική ζώνη. (Giannoulis T, αδημοσίευτο άρθρο)

Με βάση προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι τα δείγματα της υβριδικής ζώνης παρουσιάζουν κυρίως το Νοτιοανατολικό Ευρωπαϊκό πρότυπο (κόκκινο), ενώ το Κεντρικό Ευρωπαϊκό (μπλε) πρότυπο βρίσκεται σε μικρές συχνότητες και το Ανατολικό (πράσινο) σχεδόν απουσιάζει.

Στη μελέτη αυτή, όσον αφορά τον υβριδικό πληθυσμό, επιβεβαιώθηκε η εισαγωγή του mtDNA στην υβριδική ζώνη, χωρίς όμως να ακολουθηθεί από την εισαγωγή του πυρηνικού DNA του Ανατολικού απλότυπου. Η εξήγηση δόθηκε με βάση προηγούμενες μελέτες και τη θεωρία που αναπτύχθηκε από τους Petit και Excoffier.



Εικόνα 4: (Giannoulis T, αδημοσίευτο άρθρο)

1.6 Χρωμόσωμα Υ

Το χρωμόσωμα Υ είναι ένα από τα δυο φυλετικά χρωμοσώματα τα οποία διαθέτουν σε κάθε κύτταρο τα περισσότερα θηλαστικά και περιέχει μεταξύ άλλων το γονίδιο SRY (sex determination region) , το οποίο όταν είναι παρόν, ενεργοποιεί την ανάπτυξη των όρχεων και καθοδηγεί τη δημιουργία αρσενικών φαινοτύπων.

Το χρωμόσωμα Υ είναι εκτεθειμένο σε σχετικά υψηλούς ρυθμούς μεταλλαξιογένεσης σε σχέση με το υπόλοιπο πυρηνικό γονιδίωμα. Το χρωμόσωμα Υ μεταβιβάζεται αποκλειστικά από το σπέρμα το οποίο υποβάλλεται σε πολλαπλές κυτταρικές διαιρέσεις κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. Κάθε κυτταρική διαίρεση αποτελεί μια επιπλέον ευκαιρία για συσσώρευση μεταλλάξεων. Επιπλέον το σπέρμα αποθηκεύεται σε ιδιαίτερα όξινο περιβάλλον το οποίο προκαλεί περαιτέρω μεταλλάξεις. Οι 2 αυτοί παράγοντες δημιουργούν τις συνθήκες ώστε το χρωμόσωμα Υ να διατρέχει ένα κίνδυνο μεταλλάξεων 4,8 φορές μεγαλύτερο από το υπόλοιπο γονιδίωμα.

Το φαινόμενο της γενετικής παρέκκλισης είναι ιδιαίτερα έντονο στο χρωμόσωμα Υ λόγω: το πληθυσμιακό μέγεθος του χρωμοσώματος Υ είναι περιορισμένο κληρονομικά στο $\frac{1}{4}$ σε σχέση με αυτό των αυτοσωμάτων. Οι διπλοειδείς οργανισμοί περιέχουν 2 αντίγραφα των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων, ενώ μόνο ο μισός περίπου πληθυσμός περιέχει ένα χρωμόσωμα Υ. Έτσι, το φαινόμενο της γενετικής παρέκκλισης είναι ιδιαίτερα έντονο στο χρωμόσωμα Υ. Μέσω της τυχαίας διευθέτησης ένα ενήλικο αρσενικό μπορεί να μη μεταβιβάσει ποτέ το χρωμόσωμα εάν αποκτήσει μόνο θηλυκούς απογόνους. Έτσι αν και το αρσενικό μπορεί να έχει ένα καλά προσαρμοσμένο χρωμόσωμα Υ απαλλαγμένο από υπερβολικές μεταλλάξεις, μπορεί ποτέ να μην το περάσει στην επόμενη γενετική δεξαμενή.

Για όλους τους παραπάνω λόγους το χρωμόσωμα Υ αποτελεί έναν άκρως ενδιαφέροντα μοριακό δείκτη ο οποίος θα μπορούσε να δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την γενετική πληθυσμιακή δομή και την καταγωγή σύγχρονων γονιδιακών δεξαμενών στα διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του ευρωπαϊκού λαού.

1.7 Σκοπός

Στην παρούσα εργασία σκοπός ήταν η χρήση πληθυσμών της υβριδικής περιοχής του ευρωπαϊκού λαού για τη διερεύνηση εξελικτικών γεγονότων και πώς αυτά επηρεάζουν τη διαμόρφωση των φυλογεωγραφικών προτύπων του είδους. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Υ, οι οποίοι κληρονομούνται μονογονεϊκά, με σκοπό να συγκριθεί το πρότυπο κατανομής της γονιδιακής ροής με αυτό του μιτοχονδριακού DNA αλλά και με άλλους δείκτες.

Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα τμήμα του εξωνίου του γονιδίου SRY και μια περιοχή του ιντρονίου, του γονιδίου DBY8.

Η εργασία αυτή στηρίχτηκε στην ανάλυση μοριακών δεικτών το Υ χρωμοσώματος και συγκεκριμένα των γονιδίων SRY και DBY8 χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως PCR-SSCP και αλληλούχησης.

2.Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Υλικά

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

Acetic Acid

Acrylamide

Agarose

Bis-Acrylamide

dNTPs

Proteinase K

Formaldehyde

MgCl₂

NaBH₄

TEMED

AgNO₃

100bp Ladder

Kappa Taq Polymerase

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Απομόνωση DNA

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 70 δείγματα ευρωπαϊκού λαγού από περιοχές την Ευρώπης, Ανατολής και Ελλάδας. Αρχικά, απομονώθηκε το DNA από ηπατικό ιστό, που είχε ληφθεί από το κάθε ζώο ξεχωριστά, σύμφωνα με τη διαδικασία που προέβλεπε το NucleoSpin® Tissue “Genomic DNA from tissue” kit. Το DNA που απομονώθηκε από τους ιστούς ηλεκτοφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1%.

→ Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας DNA ανά δείγμα

Μετά το πέρας της απομόνωσης του DNA, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν αφού αραιώθηκε αρχικά το ολικό DNA (1μL DNA/99μL ddH₂O). Η φωτομέτρηση έγινε σε φωτόμετρο Erppendorf, το οποίο μετατρέπει τις τιμές απορρόφησης σε συγκέντρωση DNA σε κάθε διάλυμα.

2.2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων με βάση το φορτίο και το μοριακό τους βάρος. Μεταξύ αρνητικού και θετικού πόλου διέρχεται ρεύμα και υπάρχει μια αντίσταση η οποία είναι το πήκτωμα. Επομένως, όσο πιο πυκνή είναι η πηκτή αγαρόζης τόσο πιο αργή είναι η διέλευση το ρεύματος μέσα από το πήκτωμα. Τα μικρότερα μόρια κινούνται πιο γρήγορα από τα μεγαλύτερα.

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης 1%, χρησιμοποιήσαμε 0,3 gr αγαρόζης σε 50 mL TAE 1x, το διαλύσαμε με θέρμανση και ακολούθως προσθέσαμε 1μL της χρωστικής SERVA® Electrophoresis GmbH. Η χρωστική προστίθεται ώστε να προσδεθεί στη συνέχεια στις ζώνες του DNA και να είναι ορατές κατά την παρατήρηση του gel σε UV ακτινοβολία. Αφού πήξει το gel αγαρόζης, τοποθετείται σε ειδική συσκευή και τα δείγματα φορτώνονται αφού αναμειχθούν με ειδικό loading buffer. Οι ποσότητες ήταν: 3μL DNA προστίθενται 3μL loading buffer. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 150 Volts και ακολούθησε παρατήρηση σε συσκευή UV.

2.2.3. PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για το κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε PCR, με σκοπό την ενίσχυση των τμημάτων SRY(239bp) και DBY8(179bp). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε γονίδιο ήταν οι εξής:

Πίνακας 2: Εκκινητές για την αντίδραση PCR

Εκκινητές	Αλληλουχία
SRY-Fw	5'-CGGCCAGGAACGGTCAAGCG-3'
SRY-Rv	5'-CCTTCCGGCGAGGTCTGTAC-3'
DBY8-Fw	5'-CCCCAACAAGAGAATTGGCT-3'
DBY8-Rv	5'-CAGCACCACCATAKACTACA-3'

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν ειδικά Eppendorf tubes. Ο τελικός όγκος σε κάθε PCR tube ήταν 50 μ L, τα οποία περιείχαν 49 μ L από το mix και 1 μ L DNA. Το κάθε tube περιείχε τα εξής συστατικά στις παρακάτω ποσότητες (Πίνακας 3):

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος για την αντίδραση PCR

Συστατικά			Ποσότητες/ PCR tube
Buffer	10x	1x	5 μ L
MgCl ₂	50mM	2mM	1 μ L
Primers Fw	50pM	1pM	1 μ L
Primers Rv	50pM	1pM	1 μ L
DNTPs	10mM	0.2mM	1 μ L
DNA Πολυμεράση-Kappa Taq	5U/ μ L		0.2 μ L
DNA	100 ng		
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο 50 μ L ανά αντίδραση		

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR ήταν οι ακόλουθες:

Πίνακας 4: Συνθήκες PCR

Στάδια	Θερμοκρασίες-Χρόνοι	} 35 κύκλοι
Αρχική Αποδιάταξη	95°C-4 min	
Αποδιάταξη	95°C-40 sec	
Υβριδοποίηση	51°C-40 sec	
Επιμήκυνση	72°C-40 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C-10 min	

Μετά το τέλος της PCR, τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αγαρόζης 2% w/v ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης-SSCP

Στη συνέχεια, τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν ζώνες μετά την PCR αντίδραση, ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Η μέθοδος SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) ή «πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονού κλώνου» είναι ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων με βάση μικρές διαφορές στην αλληλουχία (ακόμη και ένα ζεύγος βάσεων) οι οποίες δίνουν διαφορετική δευτεροταγή δομή και διαφορετική κινητικότητα σε πηκτή.

Οι πηκτές πολυακρυλαμίδης σχηματίζονται με πολυμερισμό ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή N,N'-methylene bisacrylamide. Η πυκνότητα της πηκτής εξαρτάται από την ποσότητα της ακρυλαμίδης και του διακλαδωτή στο μείγμα. Όσο πιο μεγάλοι είναι οι πόροι της πηκτής, τόσο πιο γρήγορα κινούνται τα μόρια.

Ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων που θα ηλεκτροφορηθούν και την ποιότητα των αποτελεσμάτων που απαιτείται, χρησιμοποιούνται πηκτές πολυακρυλαμίδης με διαφορετικές συγκεντρώσεις σε κάθε περίπτωση. Τα μικρότερα μόρια μετακινούνται πιο εύκολα διαμέσου των πόρων του πηκτώματος, ενώ τα μεγαλύτερα πιο αργά. Επομένως, ανάλογα με το μέγεθος των προϊόντων που πήραμε από τις PCR επιλέγουμε και τη συγκέντρωση της πηκτής πολυακρυλαμίδης.

Τα δείγματα που πήραμε μετά από PCR με εκκινητές DBY (179bp) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή συγκέντρωσης 12%, ενώ τα δείγματα με SRY (239bp) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή 10%.

Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας 5: Σύσταση διαλύματος για πηκτή πολυακρυλαμίδης

	10% w/v	12% w/v
Ακρυλαμίδα	7,8 g	6 g
Bis-ακρυλαμίδα	0.25 g	0.2 g
Γλυκερόλη 50%	6 ml	6 ml
10x TBE Buffer	6.4ml	6.4ml
TEMED	70 μ l	70 μ l
APS 20% w/v	400 μ l	400 μ l
ddH ₂ O	Μέχρι 60ml	

Αρχικά προστέθηκαν η ακρυλαμίδα, η Bis-ακρυλαμίδα, η γλυκερόλη και το TBE σε ποτήρι ζέσεως, προστέθηκε το ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 60ml, ακολούθως το TBE και η γλυκερόλη και το διάλυμα αναδεύτηκε μέχρι να διαλυθεί.

Στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε σε έναν ογκομετρικό σωλήνα μέχρι τα 65 ml και προστέθηκαν το TEMED και το APS.

Για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 12μL PCR προϊόντος και 10μL χρωστικής SSCP και ακολούθησε αποδιάταξη των δειγμάτων.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης όπου προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα, 0,5x TBE buffer και η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 220 Volt, σε θερμοκρασία δωματίου για 18 ώρες.

2.2.4 Χρώση με νιτρικό άργυρο (AgNO_3) – Silver staining

Προκειμένου να εμφανιστούν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης θα πρέπει να γίνει χρώση του gel με νιτρικό άργυρο. Ο νιτρικός άργυρος έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA και αντιδρά με το διάλυμα της φορμαλδεΐδης, που προστίθεται, παρουσία βάσης εμφανίζοντας τις ζώνες του DNA με καφέ χρώμα σε κίτρινο gel.

Για τη χρώση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα:

Διάλυμα 1:

1mL οξικού οξέος και ddH₂O ως τα 400mL

Διάλυμα 2:

0,2g νιτρικού αργύρου διαλύεται με ανάδευση σε 200mL ddH₂O

Διάλυμα 3:

Προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 200mL σε κωνική φιάλη που περιέχει 3gr NaOH, ~0,01gr NaBH₄ και 1mL φορμαλδεΐδης.

Μεθοδολογία

1. Πλύση της πηκτής με 200mL του διαλύματος 1 για 3 λεπτά.
2. Μετά το πέρας των 2 λεπτών, το διάλυμα 1 απομακρύνεται και επαναλαμβάνεται το πρώτο βήμα.
3. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος 2, νιτρικού αργύρου για περίπου 8-10 λεπτά.
4. Αφού απορριφτεί το διάλυμα νιτρικού αργύρου, οι πηκτές ξεπλένονται δύο φορές με απιονισμένο νερό (1 λεπτό η κάθε πλύση).
5. Προσθήκη του διαλύματος 3, το οποίο αναδεύεται μέχρι οι ζώνες να είναι ορατές στην πηκτή.
6. Τέλος, πραγματοποιείται μία τελευταία πλύση με απιονισμένο νερό για περίπου 1 λεπτό, προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αργύρου που έχει παραμείνει στο gel.

Μετά το τέλος της διαδικασίας, γίνεται σύγκριση των προτύπων των διαφορετικών ατόμων ώστε να προσδιοριστούν τα άτομα που φέρουν κοινά πρότυπα και τα άτομα που διαφέρουν.

2.2.5 Αλληλούχιση

Μετά την ομαδοποίηση των ατόμων επιλέχθηκαν 1-2 αντιπροσωπευτικά άτομα από κάθε πρότυπο ώστε να γίνει αλληλούχιση. Η απομόνωση των προϊόντων PCR έγινε από πηκτή αγαρόζης σύμφωνα με τις οδηγίες του Kit.

Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να πάρουμε την αλληλουχία, ώστε να ακολουθήσει η επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής (πχ. BioEdit).

3. Αποτελέσματα

3.1 Απομόνωση DNA

Μετά την απομόνωση DNA, έγινε ηλεκτοφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v. Οι ζώνες δείχνουν τα τμήματα του πυρηνικού DNA που απομονώθηκε. Ενδεικτική εικόνα από τα αποτελέσματα φαίνεται πιο κάτω.



Εικόνα 5: Ηλεκτροφόρηση DNA

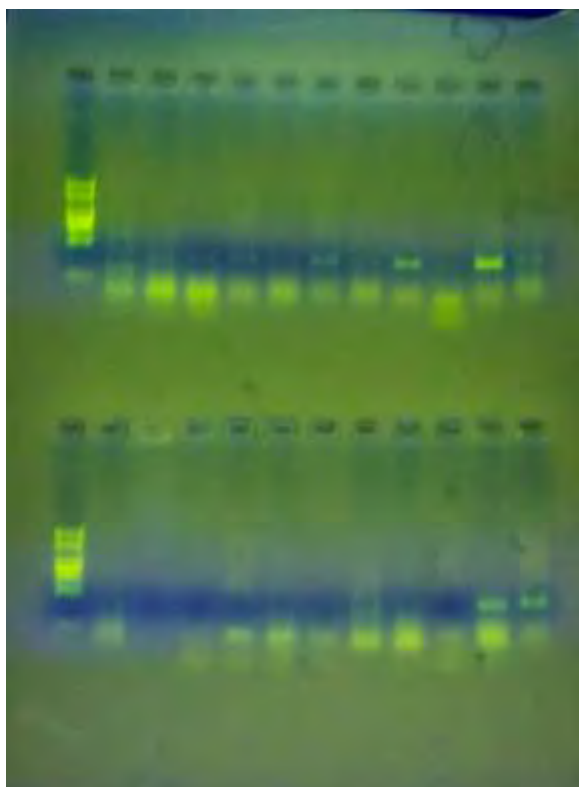
Επιπλέον, για τον προσδιορισμό της ποσότητας DNA σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πιο κάτω πίνακα. Στον πίνακα φαίνεται επίσης, η κατάταξη που έγινε με βάση προηγούμενες μελέτες μέσω ανάλυσης του mtDNA (Stamatis et al., 2007) και η ομαδοποίηση που έγινε με βάση τα πρότυπα που πήραμε μετά την ηλεκροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Πίνακας 6:

No	Δείγμα	Φωτομέτρηση	mtDNA	DBY	SRY	No	Δείγμα	Φωτομέτρηση	mtDNA	DBY	SRY
1	HR123	93	A			34	HR90	179.1	A		1
2	HR115	673.7	G	1	3	35	HR93	54.3	A		
3	HR87	197.8	E	1	3	36	HR105	406	A	1	
4	HR86	798.7	A	1	3	37	HR110	517	G	3	1
5	HR14	386.3	A	1	3	38	HR122	385.5	G		
6	HR13	217.6	A	1	3	39	HR5	305.3	E		
7	HR9	230.3	E	9	1	40	HR84	492.1	E		
8	HR6	226.3	A	1	1	41	HR91	398.9	E		
9	HR4	307.4	E	1	6	42	HR107	510.7	E	3	2
10	HR3	588.4	A	1		43	HR117	807.5	E	1	1
11	HR2	449.3	A	1		44	HR124	691.1	E	7	2
12	HR16	375	A			45	HR125	547.5	E	6	1
13	HR17	94	A			46	HR129	50.6	E		
14	HR24	56	E	1	5	47	HR130	549.5	E	4	1
15	HR25	578	E	3	5	48	HR32	167.7	E	1	4
16	HR35	265	E	1	5	49	HR33	249.7	E	1	4
17	HR81	480	A			50	HR80	36.4	A	1	
18	HR98	292	E			51	HR85	155.1	A	2	4
19	HR99	331	G	3	5	52	HR88	202.8	A	2	4
20	HR108	182	A			53	HR121	10	A	1	
21	HR109	234	A	1	5	54	HR95	154	A	2	2
22	HR7	255.9	E			55	HR96	52.4	A	5	
23	HR8	207.7	E			56	HR97	283.9	A	2	4
24	HR11	46.2	E			57	HR100	213.1	A	2	4
25	HR12	474.4	E	2	6	58	HR101	20	A		
26	HR15	393.7	E			59	HR102	321.9	A		
27	HR20	350.1	E			60	HR103	217.6	A		
28	HR22	337.8	E			61	HR104	155.5	A	5	
29	HR21	73.7	G	1		62	HR106	295.1	A		
30	HR34	211.2	A			63	HR113	183.7	A	4	2
31	HR82	272.2	G			64	HR114	250.9	A	4	3
32	HR83	438.5	A			65	HR116	136	A	8	7
33	HR120	76.1	A								

3.2 PCR

Με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών πραγματοποιήθηκε PCR για ενίσχυση των γονιδίων SRY και DBY8 σε όλα τα δείγματα και ακολούθησε ηλεκτοφόρηση σε πηκτική αгарόζης 2% w/v. Στην πιο κάτω εικόνα φαίνονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα που πήραμε.

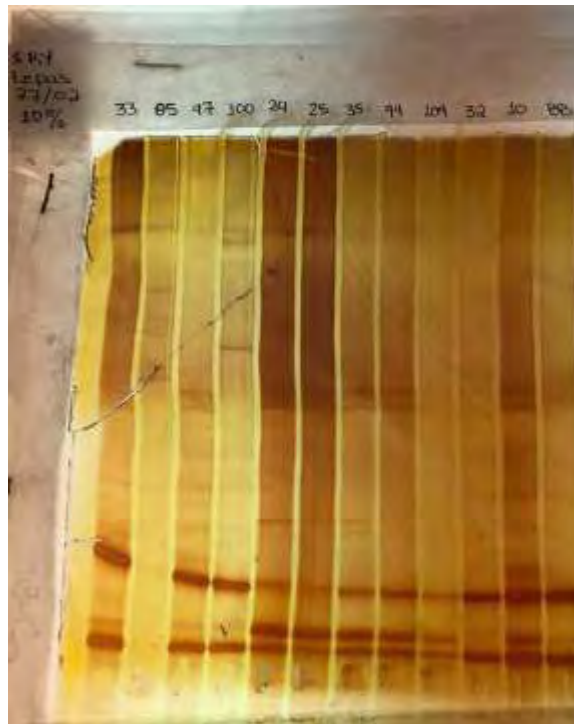


Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

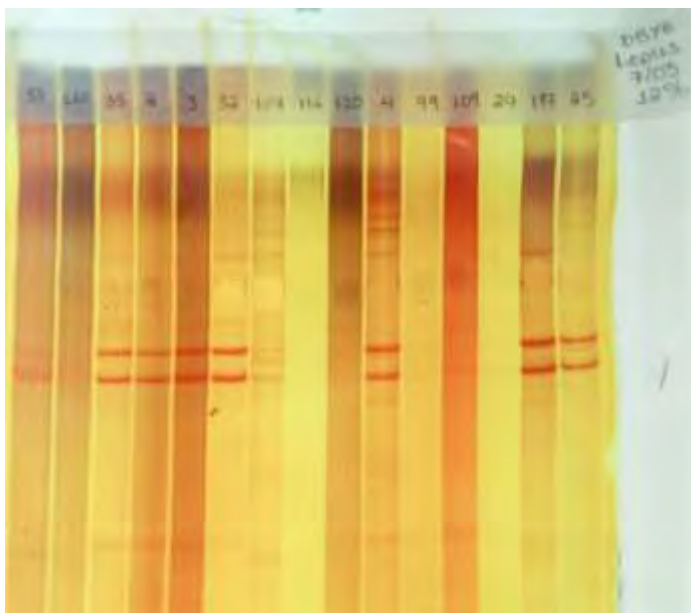
3.3 SSCP

Στη συνέχεια, έγινε ανάλυση SSCP για όλα τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν ζώνες στην ηλεκτροφόρηση, ώστε να διερευνηθεί η ύπαρξη πολυμορφισμών.

Τα αποτελέσματα φαίνονται στις πιο κάτω εικόνες, όπου διακρίνονται τα διαφορετικά πρότυπα μεταξύ των δειγμάτων. Στην εικόνα 7 φαίνονται δείγματα από PCR με εκκινητές SRY τα οποία ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%, ενώ αντίστοιχα στην εικόνα 8, προϊόντα με εκκινητές DBY8 σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12%.



Εικόνα 7: Πηκτή πολυακρυλαμίδης 10%



Εικόνα 8: Πηκτή πολυακρυλαμίδης 12%

3.4 Αλληλούχιση

Μετά τα αποτελέσματα της τεχνικής SSCP, έγινε η αλληλούχιση δειγμάτων από κάθε πρότυπο που πήραμε τόσο για το SRY, όσο και για το DBY8.

Από τα αποτελέσματα της SSCP για το DBY κάναμε ομαδοποίηση σε 9 ομάδες, από τις οποίες επιλέξαμε κάποια δείγματα για την αλληλούχιση. Από τις αλληλουχίες που πήραμε για το Y-DNA παρατηρήθηκαν 3 διαφορετικά πρότυπα, τα οποία ήταν όλα ευρωπαϊκά.

Τα αποτελέσματα φαίνονται πιο κάτω:

>EU939381.1 *Lepus europaeus* haplotype IN-B DBY (DBY) gene, exons 8, 9 and partial cds

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TG TAG

TTACTAGCAATTTTTCATCGAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTGATAAATTTT
TT

GCTTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTATGGTGGTGCT

>EU939380.1 *Lepus europaeus* haplotype IN-A DBY (DBY) gene, exons 8, 9 and partial cds

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TG TAG

TTATTAGCAATTTTTCATCCAGTCCATGGTGAAAAATTATGAATACCTGATAAATTTT
TT

GCTTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTATGGTGGTGCT

1^ο Πρότυπο:

>HR9_DBY

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TG TAG

TTACTAGCAATTTTTCATCgAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTGATAAATTTT
TT

GCTTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTATGGTGGTGCT

2° Πρότυπο:

>HR2_DBY

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TG TAG

T T A C T A G C A A T T T T T C A T C g A G T C C A T G G T G A A A A A T T A T G A T T A C C T G A T A A A T T T T
T T

G C T T G C A G T T T T C A T A C C G G T C T A G A G T T C G T C C T T G T G T A G T C T A T G G T G G T G C T

>HR114_DBY

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TG TAG

T T A C T A G C A A T T T T T C A T C g A G T C C A T G G T G A A A A A T T A T G A T T A C C T G A T A A A T T T T
T T

G C T T G C A G T T T T C A T A C C G G T C T A G A G T T C G T C C T T G T G T A G T C T A T G G T G G T G C T

3° Πρότυπο:

>HR113_DBY

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TG TAG

T T A C T A G C A A T T T T T C A T C T A G T C C A T G G T G A A A A A T T A T G A C T A C C T G A T A A A T T T T
T T

G C T T G C A G T T T T C A T A C C G G T C T A G A G T T C G T C C T T G T G T A G T C T A T G G T G G T G C T

>HR99_DBY

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TG TAG

T T A C T A G C A A T T T T T C A T C T A G T C C A T G G T G A A A A A T T A T G A C T A C C T G A T A A A T T T T
T T

G C T T G C A G T T T T C A T A C C G G T C T A G A G T T C G T C C T T G T G T A G T C T A T G G T G G T G C T

>HR124_DBY

CCCCAACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATCTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAG
TGTAG

TTACTAGCAATTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTGATAAATTTT
TT

GCTTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTATGGTGGTGCT

>HR97

CCCCaACAAGAGAATTGGCTGTGCAGATcTATGAGGAAGCCAGAAAAGTAAGTAGT
GTAG

TTACTAgCAAtTTTTTCATCTAGTCCATGGTGAAAAATTATGACTACCTGATAAATTTTT
T

GCTTGCAGTTTTTCATACCGGTCTAGAGTTCGTCCTTGTGTAGTCTATGGTGGTGCT

Από την ομαδοποίηση που κάναμε για το SRY διαχωρίσαμε τα δείγματα σε 7 διαφορετικές ομάδες. Ωστόσο, μετά την αλληλούχηση παρατηρήθηκε ότι όλα τα δείγματα ακολουθούσαν το ίδιο πρότυπο και δεν βρέθηκαν διαφορετικοί απλότυποι.

Η αλληλουχία για το εξώνιο SRY είναι η ακόλουθη:

>SRY

TCGGCCAGGAACGGGTCAAGCGACCCATGAACGCGTTCATGGTGTGGTCCCAACA
TCAGA

GACGCCAGGTGGCTCTGCAGAATCCCAAATGCGAAACTCAGACATCAGCAAGCA
GCTGG

GACACCAGTGGAATGCTTTCAGAAGCTGAAAAATGGCCATTCTTCCAGGAGGC
GCAA

GACTGCAGGCGGTGCACAAAGAGAAATACCGGACTAGA

Στον πίνακα 7, φαίνονται τα δείγματα για τα οποία έγινε αλληλούχιση και η κατάταξη τους στην Ευρωπαϊκή ή Ανατολική ομάδα όσον αφορά το χρωμόσωμα Υ, σε σύγκριση με το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (προηγούμενες μελέτες) και το πρότυπο που κατατάσσονται με βάση την αλληλουχία του DBY8.

Πίνακας 7: Κατάταξη δειγμάτων

Δείγμα	mtDNA	Y-DNA	Πρότυπο DBY8
HR100	A	E	3
HR105	A	E	2
HR107	E	E	3
HR109	A	E	2
HR110	G	E	3
HR113	A	E	3
HR114	A	E	2
HR115	G	E	2
HR117	E	E	2
HR12	E	E	3
HR121	A	E	2
HR124	E	E	3
HR13	A	E	2
HR130	E	E	3
HR14	A	E	2
HR2	A	E	2
HR21	G	E	2
HR24	E	E	2
HR25	E	E	3
HR3	A	E	2
HR32	E	E	2
HR33	E	E	2
HR35	E	E	2
HR4	E	E	2
HR6	A	E	2
HR80	A	E	2
HR85	A	E	3
HR86	A	E	2
HR87	E	E	2
HR88	A	E	3
HR9	E	E	1
HR95	A	E	3
HR97	A	E	3
HR99	G	E	3

4.Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή, εξετάστηκαν δείγματα ευρωπαϊκού λαγού (*L. europaeus*) και αναλύθηκαν όσων αφορά την αλληλουχία μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Υ, ώστε να ερευνηθεί η γονιδιακή ροή. Τα δείγματα προέρχονταν από πληθυσμούς λαγών στην περιοχή της Θράκης, όπου υπάρχει υβριδική ζώνη.

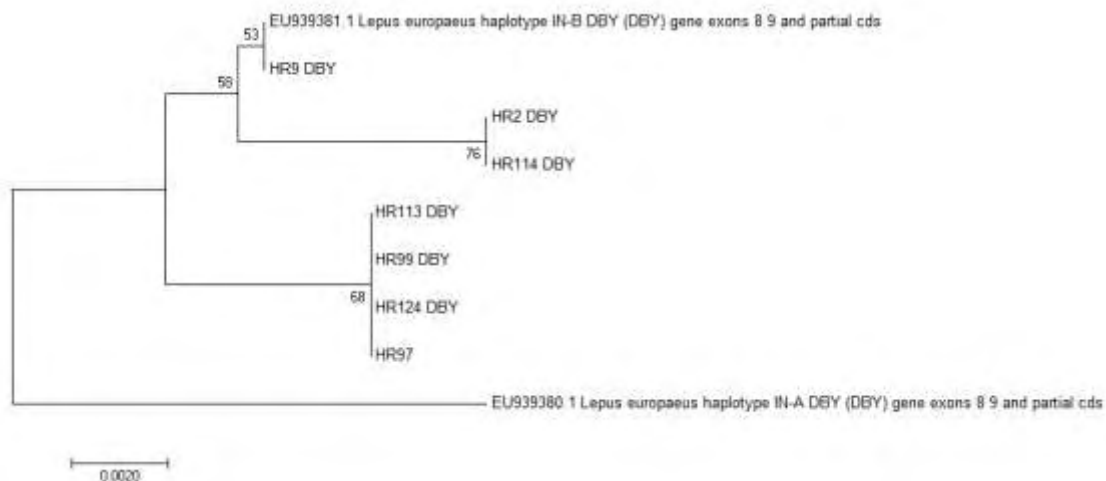
Πραγματοποιήθηκε ανάλυση μοριακών δεικτών του χρωμοσώματος Υ, οι οποίοι κληρονομούνται μονογονεϊκά, με σκοπό να συγκριθεί το πρότυπο κατανομής της γονιδιακής ροής με αυτό του μιτοχονδριακού DNA αλλά και με άλλους δείκτες. Το Υ χρωμόσωμα των θηλαστικών έχει αυστηρά πατρική κληρονόμηση και μικρότερο ρυθμό μεταλλάξεων σε σχέση με το mtDNA (Schaffner, 2004). Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένα τμήμα του εξωνίου του γονιδίου SRΥ και μια περιοχή του ιντρονίου, του γονιδίου DBΥ, οι οποίοι δεν εμφανίζουν κανένα ανασυνδιασμό. (Gubbay et al., 1990, Sinclair et al., 1990, Hellborg και Ellegren, 2004)

Σε προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει, προκύπτει διαχωρισμός των δειγμάτων σε δύο διαφορετικές φυλογενετικές τάξεις (Clade A και B). Λαγοί από την ηπειρωτική Ελλάδα και τα ελληνικά νησιά της Λευκάδας, της Νάξου, των Κυθήρων και της Κρήτης, όπως επίσης από την Βουλγαρία, την Ιταλία και την κεντρική Ευρώπη (Γερμανία, Αυστρία, Ουγγαρία, Σερβία, Ρουμανία), ομαδοποιήθηκαν στην τάξη B. Παράλληλα, λαγοί από τη Βουλγαρία, τις περιοχές της ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης, τα νησιά του ανατολικού Αιγαίου (Λέσβος, Χίος, Σάμος, Ρόδος), όπως και από τις περιοχές της Κύπρου και του βόρειου Ισραήλ, ομαδοποιήθηκαν στην τάξη A (Kasapidis et al., 2004). Αυτές οι τάξεις αν και γεωγραφικά διακριτές παρουσιάζουν μια ζώνη επικάλυψης στην περιοχή της Θράκης και της Βουλγαρίας, η οποία πιθανώς εκτείνεται στην Τουρκική Θράκη δυτικά του Βοσπόρου και ίσως στην Μικρά Ασία, αλλά στερούμαστε δειγμάτων για την απόδειξη αυτού. Αυτή η περιοχή είναι γνωστή ως υβριδική ζώνη (Hewitt, 1999) για είδη τα οποία περιορίστηκαν στα νότια βαλκάνια και στην Μικρά Ασία κατά τους Πλειστοκαινικούς παγετώνες. Για τον ευρωπαϊκό λαγό φαίνεται ότι η δημιουργία αυτής της ζώνης επικάλυψης είναι το αποτέλεσμα μιας δευτερεύουσας επαφής αποκλινόντων γονιδιακών δεξαμενών μεταξύ ενός πληθυσμού προσφύγων στα νότια Βαλκάνια και ενός ανατολικού πληθυσμού. Η ζώνη επικάλυψης είναι ευρεία και διάχυτη και αυτό οφείλεται μάλλον όχι μόνο σε φυσική διασπορά αλλά και σε σκόπιμες μετατοπίσεις. Αυτό μπορεί να συμβαίνει στη Βουλγαρία, όπου η ανάμιξη των δύο ομάδων σε όλη σχεδόν τη χώρα πιθανόν να προέκυψε από σκόπιμες μετατοπίσεις λαγών από τις ανατολικές προς τις δυτικές περιοχές, μεταξύ του 1970 και 1980, κατά τη διάρκεια των πρακτικών διαχείρισης του κυνηγιού (Suchentrunk, 2000, P.Kasapidis, 2004).

Από τις προηγούμενες μελέτες στο μιτοχονδριακό DNA αποδείχθηκε η παρουσία μιας μεγάλης ζώνης επικάλυψης απλοτύπων στη Βουλγαρία και τη Βορειοανατολική Ελλάδα. Στην περιοχή αυτή παρατηρείται και η παρουσία των δυο απλοτύπων που προέκυψαν από την ανάλυση των δεικτών του χρωμοσώματος Υ, του ευρωπαϊκού και του ανατολικού απλοτύπου. Ενισχύεται έτσι η θεωρία περί ύπαρξης γονιδιακής ροής από περιοχές της Ανατολής προς την Ευρώπη, μέσω μίας ζώνης ξηράς στην περιοχή του Βοσπόρου την Τελευταία Περίοδο του Πλειστόκαινου, η οποία εξαφανίστηκε λόγω της αύξησης της στάθμης της θάλασσας 8000 χρόνια π.Χ..

Σε μία πιο πρόσφατη μελέτη, στην περιοχή επικάλυψης των δύο διαφορετικών φυλογενετικών προτύπων, διευκρινίστηκε η ζώνη επαφής ορίζοντας το περιορισμένο μοτίβο διανομής των δύο ομάδων. Μέσω του εντοπισμού ατόμων της υβριδικής ζώνης και της ταυτοποίησης των γενετικών ορίων που υπάρχουν στην συγκεκριμένη περιοχή της συνύπαρξής τους. Τα αποτελέσματα τόσο στο πυρηνικό, όσο και στο μιτοχονδριακό DNA υποδεικνύουν υψηλή γενετική διαφοροποίηση, μεταξύ των δύο ομάδων. Η ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA έγινε με Dloop και του πυρηνικού με μικροδορυφόρους. Εδραιώνεται η ύπαρξη μίας υβριδικής ζώνης μεταξύ των δύο σημαντικά διαφορετικών δεξαμενών γονιδίων οι οποίες συνυπάρχουν στην βορειοανατολική Ελλάδα (Antonίου et al., 2013).

Ωστόσο, τα δεδομένα της ανάλυσης αποκάλυψαν χαμηλά επίπεδα γενετικού πολυμορφισμού των δεικτών του χρωμοσώματος Υ, κάτι που είχε αναφερθεί και σε προηγούμενη μελέτη του γονιδίου SRY στον ευρωπαϊκό λαγό (Putze et al., 2007). Συγκεκριμένα, για το γονίδιο SRY δεν εντοπίστηκαν διαφορετικά πρότυπα αλληλουχίας στα δείγματα τα οποία προέρχονταν από την υβριδική ζώνη. Ενώ για το γονίδιο DBY8, παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα πολυμορφισμού, ενώ όλα τα πρότυπα που βρέθηκαν κατατάσσονταν στο ευρωπαϊκό. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με προηγούμενες μελέτες που έγιναν για το μιτοχονδριακό γονιδίωμα του *Lepus europaeus* στην υβριδική ζώνη, επιβεβαιώνεται η θεωρία των Petit και Excoffier ότι το μιτοχονδριακό DNA έχει μεγαλύτερα ποσοστά εισαγωγής, σε σχέση με το πυρηνικό/ Υ-DNA.



Εικόνα 9

Η μελέτη της υβριδικής ζώνης είναι πολύ σημαντική γιατί μας επιτρέπει να μελετήσουμε την εισροή των γονιδίων μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών, να κατανοήσουμε προσαρμοστικές αλλαγές και να προσδιορίσουμε γενετικές διαφοροποιήσεις υπεύθυνες για την ειδογένεση.

Μελλοντικά αναμένεται η περαιτέρω μελέτη γονιδίων που σχετίζονται με προσαρμογή όπως, MHC, μιτοχονδριακά γονίδια του OXPHOS, N-mt γονίδια του OXPHOS. Αλλά και προσδιορισμός γενετικού φραγμού στη μετακίνηση και την ανάμειξη πληθυσμών πέρα από την υβριδική ζώνη .

5.Βιβλιογραφία

1. Emerson BC. Evolution of oceanic islands: Molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Mol Ecol.*2002;11(6):951-66
2. Hewitt GM. Hybrid Zones – Natural Laboratories for Evolutionary Studies. *TREE.*1988;3(7):158-167
3. Baker AJ, Jenkins PF. Founder effect and cultural evolution of songs in an isolated population of chaffinches, *Fringilla coelebs*, in the Chatham islands. *Animal Behaviour.*1987; 35(6):1793-1803
4. Fernandez-Garcia JL, Carranza J, Martinez JG, Randi E. Mitochondrial D-loop phylogeny signals two native Iberian red deer (*Cervus elaphus*) Lineages genetically different to Western and Eastern European red deer and infers human-mediated translocations. *Biodivers Conserv.*2014; 23:537-554
5. van Andel TH, Shackleton JC. Late Paleolithic and Mesolithic Coastlines of Greece and the Aegean. *Journal of Field Archaeology.*1982;9:445-454
6. Sfenthourakis S, Triantis AK. The Aegean archipelago: a natural laboratory of evolution, ecology and civilisations. *J of Biol Res-Thessaloniki.*2017;24(4):1-13
7. Barton NH, Hewitt GM. Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature.*1989; 341:497-503
8. Hewitt GM. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature.*2000;405:907-913
9. Hewitt GM. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil Trans R Soc Lond B.*2004; 359:183-195
10. Wayne KT, Lehman N. Mitochondrial DNA variability of the Gray Wolf: Genetic consequences of Population Decline and Habitat Fragmentation. *Conservation Biology.*1992; 6(4):559-569
11. Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology.*1998; 7(4):453-464

12. Dubey S, Zaitsev M, Cosson JF, Abdukadier A, Vogel P. Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Mol Phylogen Evol.*2006; 38(3):635-647
13. Orth A, Auffray AJ, Bonhomme F. Two deeply divergent mitochondrial clades in the wild mouse *Mus macedonicus* reveal multiple glacial refuges south of Caucasus. *Heredity.*2002; 89:353-357
14. Burton RS, Ellison CK, Harrison JS. The Sorry State of F2 Hybrids: Consequences of Rapid Mitochondrial DNA Evolution in Allopatric Populations. *The American Naturalist.*2006; 168:14-24
15. Smith S, Turbill C, Suchentrunk F. Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular ecology.*2010; 19(1):36-43
16. Bilgin R. Back to the suture: The Distribution of Intraspecific Genetic Diversity in and Around Anatolia. *Int J Mol Sci.*2011; 12:4080-4103
17. Flux JEC. Introduction to taxonomic problems In hares. *Acta Zoologica Fennica.*1983; 174:7-10
18. Fraguglione D. Introduction artificielle et tentative d'_acclimatation due lièvre commun (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) (par le monde). *Royal Saint Hubert Club Belgique.*1964;pp 1-16
19. Suchentrunk F, Ben Slimen H, Stamatis C, Sert H, Scandura M, Apollonio M, Mamuris Z. Molecular approaches revealing prehistoric, historic, or recent translocations and introductions of hares (Genus *Lepus*) by humans. *Human Evolution.*2006; 21:151-165
20. Kasapidis P, Suchentrunk F, Magoulas A, Kotoulas G. The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution.*2005; 34:55-66

21. Stamatis C, Suchentrunk F, Moutou AK, Giacometti M, Haerer G, Djan M, Vapa L, Vukovic M, Tvrtkovic N, Sert H, Alves PC, Mamuris Z. Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia?. *J Biogeogr.*2009; 36:515-528
22. Antoniou A, Magoulas A, Platis P, Kotoulas G. Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. *Genetics.*2013; 141:23-40
23. Djan M, Stefanovic M, Velickovic N, Lavadinovic V, Alves PC, Suchentrunk F. Brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from the Balkans: a refined phylogeographic model. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy.*2017; 28(2):196-193
24. Amoutzias GD, Giannoulis T, Moutou AK, Psarra AMG, Stamatis C, Tsipourlianos A, Mamuris Z.. *PLoS ONE.*2016; 11(7):e0159939
25. Blier PU, Dufresne F, Burton RS. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *TRENDS in Genetics.*2001; 17(7):400-406
26. Giannoulis T, Stamatis C, Tsipourlianos A, Mamuris Z. Mitogenomic analysis in European brown hare (*Lepus europaeus*) proposes genetic and functional differentiation between the distinct lineages. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal.*2017; 27:1-8
27. Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf FW. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends in Ecology & Evolution.*2004; 19(5):238-244
28. Koutsogiannouli EA, Moutou AK, Sarafidou T, Stamatis C, Spyrou V, Mamuris Z. Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (*Lepus europaeus*). *Molecular Ecology.*2009; 18(22):4631-4649
29. Smith TR, Tang X, Maricic I, Garcia Z, Fanchiang S, et al. Dendritic cells use endocytic pathway for cross-priming class Ib MHC-restricted CD8 α α +TCR α β + T cells with regulatory properties. *J Immunol* 182: 6959–6968.2009;
30. Penn DJ, Potts WK. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex Genes. *The American Naturalist.*1998; 153(2)

31. Piertney SB, Oliver MK. The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*.2006; 96:7-21
32. Hughes AL, Yeager M, Tel Elshof AET. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunology Today*.1999; 20(1):22-26
33. Yeager M, Hughes AL. Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. *Immunological reviews*.1999; 167(1):45-48
34. Iacovakis C, Mamuris Z, Moutou AK, Touloudi A, Hammer AS, Valiakos G, Giannoulis T, Stamatis C, Spyrou V, Athanasiou LV, Kantere M, Asferg T, Giannakopoulos A, Salomonsen CM, Bogdanos D, Birtsas P, Petrovska L, Hannant D, Billinis C. Polarisation of Major Histocompatibility Complex II host genotype with pathogenesis of European brown hare syndrome virus. *PLOS ONE*.2013; 8(9): e74360
35. Hedrick PW. Evolutionary genetics at the major histocompatibility complex. *American naturalist*.1994; 143:954-964
36. Bernatchez L, Laundry C. MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology*.2003; 16:363-377
37. Sommer S. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in Zoology*.2005; 2:16
38. Smith S, Mang T, de Bellock JG, Schaschl H, Zeitlhofer C, Hackländer K, Suchentrunk F. Homozygosity at a class II MHC locus depresses female reproductive ability in European brown hares. *Molecular Ecology*.2010; 18:4131-4143
39. Stamatis C, Suchentrunk F, Sert H, Triantaphyllidis C, Mamuris Z. Genetic evidence for survival of released captive-bred brown hares *Lepus europaeus* during restocking operations in Greece. *Oryx*.2007; 41(4):548-551
40. Fain MA, Zhao T, Kindt T. Improved typing procedure for the polymorphic single-copy RLA-DQA gene of the rabbit reveals a new allele. *Tissue Antigens*.2001;57:332-338

41. Pierpaoli M, Riga F, Trocchi V, Randi E. Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Mol Ecol.*1999; 8(11):1805-17
42. Rico C, Rico I, Webb N, Smith S, Bell D, Hewitt G. Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics.*1994; 25(5):367
43. Surridge AK, Bell DJ, Rico C, Hewitt GM. Polymorphic microsatellite loci in the European Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in the other lagomorph species. *Animal genetics.*1997; 28(4):302-305
44. Mougel F, Mounolou JC, Monnerot M. Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal genetics.*1997; 28:58-71
45. Jombart T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics.*2008; 24:1403-1405
46. Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics.*2011;27:3070-3071
47. Pond SL, Frost SD. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics.*2005; 21:2531-2533
48. Pond SL, Frost SD. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol Biol Evol.*2005; 22:1208-1222
49. Bondinas GP, Moustakas AK, Papadopoulos GK. The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. *Immunogenetics.*2007; 59:539-553
50. Leigh JW, Bryant D. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.*2015; 6(9):1110–1116
51. Matschiner M, Salzburger W. TANDEM: integrating automated allele binding into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics.*2009; 25(15): 1982-1983
52. Rousset F. genepop' 007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources.*2008; 8:103-106
53. Rise WR. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution.*1989; 43:223-225
54. Holm S. A simple sequential rejective multiple test procedure. *Scand J Stat.*1979; 6:65-70

55. Waples RS. Testing for Hardy-Weinberg Proportions: Have We Lost the Plot?. *Journal of Heredity*.2015; 106(1):1-19
56. Dieringer D, Schlötterer C. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Resources*.2003; 3(1):167-169
57. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*.2005; 14:2611-2620
58. Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo A, Lareu MV. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings and supporting software. *Front Genet*.2013; 4:98
59. Jones OR, Wang J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Molecular Ecology Resources*.2009; 10(3):551-555
60. Payseur BA. Using differential introgression in hybrid zones to identify genomic regions involved in speciation. *Molecular Ecology Resources*.2010; 10(5):806-820
61. Wolf JBW, Ellegren H. Making sense of genomic islands of differentiation in light of speciation. *Nature Reviews Genetics*.2017; 18:87-100
62. Pfau RS, Van Den Bussche RA, McBee K, Lochmiller RL. Allelic diversity at the Mhc-DQA locus in cotton rats (*Simgodon hispidus*) and a comparison of DQA sequences within the family muridae (Mammalia:Rodentia). *Immunogenetics*.1999; 49:886-893
63. De Bellock JG, Delarbre C, Gachelin G, Morand S. Allelic diversity at the Mhc-DQA locus of woodmouse populations (*Apodemus sylvaticus*) present in the islands and the mainland of the northern Meditteranean. *Glob Ecol Biogeogr*.2005; 14:115-122
64. Amills M, Ramíres O, Tomàs A, Obexer-Ruff G, Vidal O. Positive selection on mammalian MHC-DQ genes revisited from a multispecies perspective. *Genes and Immunity*.2008; 9:651-658
65. Rand DM. The units of selection on Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics*.2001; 32:415-448

66. Jia S, Chen H, Zhang G, Wang Z, Lei C, Yao R, Han X. Genetic Variation of Mitochondrial D-loop Region and Evolution Analysis in Some Chinese Cattle Breeds. *Journal of Genetics and Genomics*.2007; 34(6):510-518
67. Wilkinson SG, Chapman MA. Length and sequence variation in Evening Bat D-Lool mtDNA. *Genetics*.1991; 128:607-617
68. Brown JR, Beckenbach AT, Smith MJ. Mitochondrial DNA Length Variation and Heteroplasmy in Populations of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*.1992;132:221-228
69. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica acta*.1999; 1410:103-123
70. Clayton AD. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction*.2000;15:11-17
71. Hill J, Chen Z, Xu H. Selective propagation of functional mitochondrial DNA during oogenesis restricts the transmission of a deleterious mitochondrial variant. *Nature Genetics*.2014; 46(4):389-393
72. Sert H, Suchentrunk F, Erdogan A. Genetic diversity within Anatolian brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) and differentiation among Anatolian and European populations. *Mammalian Biology*.2005; 70:171-186
73. Cheylan G. Patterns of Pleistocene turnover, current distribution and speciation among Mediterranean mammals. In: *Biogeography of Meditterenean Invasion* (eds Groves RH, Di Castri F). Cambridge University Press,Cambridge. pp.1991; 227-262
74. Roberts N, Kuzucuoglu C, Karabiyikoglu M. The Late Quaternary in the Eastern Mediterranean region: an introduction. *Quaternary Science Reviews*.1999; 18:497-499
75. Hale ML, Burg TM, Steeves TE. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 individuals per Population is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLOS ONE*.2012; 7(9):e45170
76. Ellison CD, Burton RS. Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution*.2008; 62(3):631-638
77. Ellison CK, Burton RS. Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. *Evolution*.2006; 60(7):1382-1391

78. Hutter P. X-linked small GTPase and OXPHOS genes are candidates for the genetic bases of hybrid inviability in *Drosophila*. *Development Genes and Evolution*. 2002; 212(10):504-512
79. Petit R, Excoffier L. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*. 2009; 24(7):386-393
80. Bray Y, Devillard S, Marboutin E, Mauvy B, Peroux R. Natal dispersal of European hare in France. *J Zool*. 2007; 273:426-434
81. Avril A, Leonard Y, Letty J, Peroux R, Guitton JS, Pontier D. Natal dispersal of European hare in a high-density population. *Mamm Biol*. 2011; 76:148-156